Plant Pathology Bulletin 13: 291-298, 2004

感染菊花之番茄種子不稔病毒之分子與血清檢測

林玫珠[1]　張清安[1, 2]　陳金枝[1]　鄭櫻慧[1]

[1] 台中縣霧峰鄉　行政院農業委員會 農業試驗所 植物病理組
[2] 聯絡作者，電子郵件：cachang@wufeng.tari.gov.tw
接受日期：中華民國 93 年 8 月 26 日

摘　要

林玫珠、張清安、陳金枝、鄭櫻慧. 2004. 感染菊花之番茄種子不稔病毒之分子與血清檢測. 植病會刊 13：291-298.

菊花為國際性重要之花卉作物，其種苗以扦插為主要繁殖方式，故必須避免系統性病原的感染。已知的系統性病原中番茄種子不稔病毒(*Tomato aspermy virus*, 簡稱 TAV) 可造成感受性菊花品系花朵畸形而影響商品價值。本研究根據已知之 TAV 鞘蛋白基因 (CP) 之上下游區域設計一專一性引子對(TAV-up/TAV-dw)，於反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR) 下，可穩定地由彰化地區所採集之菊花樣品中增幅出一個符合預期 780 bp 之 DNA 產物。此產物經選殖及核酸定序分析確定其全長為 776 個核苷酸，與登錄於 GenBank 之 TAV CP 基因 (D01015) 有高達 92 % 之相同度，且渠等之胺基酸序列相同度亦高達 93 %，此結果證實 TAV 已存在於台灣菊花。為獲得純化 TAV 鞘蛋白以製備病毒偵測用抗體，本研究採取利用細菌表現病毒鞘蛋白之策略，根據所得之 TAV 鞘蛋白基因序列設計分別包含 *Nco* I 及 *Xho* I 限制酵素切位之專一性引子對 (TAV-up1 及 TAV-dw1)，將 TAV CP 之轉譯架構加以增幅並構築於蛋白表現載體 pET-28b (+) 上，其後將其轉型於 *Escherichia coli* strain BL21(DE3) pLysS 寄主內進行蛋白表現；經 IPTG 誘導結果得到一 31 kDa 之表現蛋白，經西方轉漬法證實此蛋白可與商業化 TAV 抗體 (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA) 反應，確定為 TAV 之鞘蛋白。將此蛋白大量純化後進行每隔一週連續四次之紐西蘭白兔免疫注射以製備抗血清。此抗血清可應用於酵素聯結抗體免疫吸附法 (ELISA) 偵測田間菊花樣品之 TAV 感染，與商用 Agdia TAV 抗體比較，對同一稀釋倍數之田間菊花樣品本抗體所測得之反應值均高於與Agdia TAV 抗體之反應值，對健康菊花樣品之背景值也較低。此結果顯示以此策略所製備之抗體反應性已不亞於商業應用抗體。但本研究所製備之 TAV 抗體於 ELISA 下仍會與TAV 具親緣性之胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 發生交叉反應 (cross reaction)；反之，本研究室過去所製備之CMV 抗體並不會與TAV 菊花樣品反應。此結果顯示應用血清試驗偵測TAV 時需以CMV 抗體同時進行雙向試驗(reciprocal tests) 方能獲得正確鑑別結果。另外以前述TAV 專一性引子對 (TAV-up/TAV-dw) 於 RT-PCR 反應下只能與 TAV 反應增幅出預期之 780 bp 產物，而不會與 CMV 產生任何增幅反應。證實 TAV 與CMV 雖具血清類緣關係，但二者分子特性上仍有明顯差異。

關鍵詞：菊花、番茄種子不稔病毒、聚合酵素連鎖反應、表現載體、胡瓜嵌紋病毒、血清學、細菌表現病毒鞘蛋白

緒　言

菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 為台灣栽培面積最大的切花作物，目前維持在 1,600 公頃左右，主要產區集中於彰化田尾及永靖一帶，近年來雲林、嘉義及高雄亦有逐漸增加的趨勢 (7, 9)。菊花之栽培除育種上以種子繁殖外，其商業栽培多以扦插苗方式為之 (9)，因此必須保留原種母本，作為繁殖扦插苗之採穗來源。繁殖過程中更必須避免原種母本遭受系統性病原包括病毒、細菌及類病毒之感染，否則所繁殖之扦插苗將無可避免的成為帶原者，不僅影響後續切花之生產，更可能造成病原之廣泛散播 (10, 18, 19)。歐美各國菊花種苗之生產均由專業菊花種苗公司負責，建立完整之健康種苗繁殖體系，結合病原檢查技術與驗證流程，以確保扦插苗之健康品質與商業信譽(10)。我國過去雖然在菊花之外銷上有顯著之成果，但在種苗生產上並未建立類似國外菊花種苗公司之生產系統，對於感染菊花之病毒性病害亦未有完整之資料記載 (4)。根據國際文獻記載，菊花上共有五種病毒發生之記錄 (10, 18, 19)，但以菊花嵌紋病毒 (*Chrysanthemum mosaic virus* B, CVB) (10, 11, 18)，番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) (10, 11, 17, 18) 及番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (10, 14, 18) 三者較具具經濟重要性。另外文獻上有也二種類病毒(viroid) 危害菊花之記錄，但以菊花矮化類病毒 (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) 之發生較普遍(10, 15, 18)。本研究室近年來調查國內菊花病毒種類，發現 TAV 、CVB

及 CSVd 均已普遍存在許多商業菊花品種及保存之親本與種源中 [5]。考量未來我國菊花種苗產業必須建立健康種苗生產體系之趨勢，開發並建立菊花病毒檢定技術乃必要之作爲。本文乃敘述以細菌表達病毒鞘蛋白基因之技術製備對應 TAV 之多元抗體與建立檢定之流程，另外也探討 TAV 鞘蛋白基因之分子特性及其與近緣病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 間之差異。

材料與方法

材料來源與保存方式

供試之菊花病毒材料乃取自台中區農業改良場之菊花種源圃及永靖鄉農民所保留的商業品種圃。所得材料與 TAV 抗體(Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 反應確定感染後，將其葉片切成 1 cm^2 小塊浸於 50 % 甘油溶液中置於 -20℃ 下冷凍長期保存。同時也將感病材料以扦插苗方式繁殖保存，作爲新鮮材料備用。健康無病毒感染之對照用菊花苗乃來自台花公司所提供之編號 SD0034 材料，經如下所述之ELISA 檢定確定未感染TAV 後保存備用。

酵素連結抗體免疫吸附法 (Emzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

本試驗所採用之 ELISA 流程乃遵照間接式(antigen-coating indirect ELISA) 程序進行，詳細之測定流程如已發表之報告所述 [6, 12, 13]。評定反應結果乃依健康菊花對照樣品在 405 nm 下之平均吸光度 (absorbance) 之二倍值作爲臨界點，樣品之吸光度超出此臨界點範圍者即認定爲感染病毒之樣品。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

本試驗供試RNA 乃以商用植物全量RNA 萃取試劑組(Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 由0.1 g 植物組織中抽取而來。抽取程序乃依據廠商建議流程進行，所得RNA 試料均保存於 -70℃ 備用。進行 TAV 病毒偵測時乃依據 O'Reilly *et al.* [21] 所發表之TAV 鞘蛋白基因(CP) 序列針對其上下游區域設計專一性引子對 TAV-up (5'-TAGGTTTGTGAGTGGTTAGA-3') 及 TAV-dw (5'-ATCTTCACAATCACATCCAT-3')。進行RT-PCR 偵測時，先取 3 μl 之植物總量RNA 依據反轉錄試劑組(Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA) 之建議程序進行RT，獲得互補股cDNA 後再進行PCR 反應 [16]。進行PCR 時每一50 μl 反應液中分別加入 2 μl cDNA、5 μl 10x PCR buffer、4 μl 2.5 mM dNTP、0.5U Ex*Taq* polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 及各 2.5 μl 之20 μM 引子對，於熱循環反應儀 (GeneAmp Model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中進行30 個循環反應。反應條件每一循環依序爲94 ℃，2 分鐘；52℃，1 分鐘；72℃，2 分鐘，最後一個循環以 72℃處理 6 分鐘。增幅結果則以 1.2 % 洋菜膠進行電泳分析 [22]。

基因選殖與分析

擬選殖經 PCR 增幅之TAV CP 時先以QIAquick Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 所建議之程序將PCR 產物加以純化，再遵循廠商所提供之步驟將其選殖於 pCR II-TOPO 載體上(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 並轉殖於大腸桿菌 (*Escherichia coli* strain Topo 10F') 中備用。擬分析PCR 產物之 DNA 序列時乃將含嵌入序列質體之轉殖菌株，送交明欣生物技術公司以ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀(Perkin-Elmer, CA, USA)及其配用之非放射性標幟反應試劑組(ABI PRISM BioDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核苷酸序列解析，解序所得以Scan DNASIS 核酸序列分析軟體 (Hitachi Software Engineering America, Ltd., California, USA) 進行序列分析比對。

TAV鞘蛋白基因表現載體之構築及分析

根據上述所獲之 TAV CP 序列設計出可以將完整鞘蛋白增幅選殖之專一性引子對，並於上下游引子對中分別加入限制酵素 *Nco* I 及 *Xho* I 之專一性切位，然後以選殖之 TAV CP 轉殖株質體DNA 爲模板進行PCR 反應。增幅所得產物以上述限制酵素先行切割後再與經相同酵素切割之蛋白表現載體pET-28b (+) (Novagen, Inc., Madison, WI, USA) 以T4 DNA ligase 進行黏合，進而轉殖於*E. coli* strain DH5α 中。其後以載體構築區 (cloning region) 上下游之T7 promoter 及terminator 序列爲引子對進行PCR 篩選，篩出含嵌入 TAV CP 序列之表現載體菌株後再將其轉殖到適合外源蛋白表現之*E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS 上。

分析不同轉型株之蛋白表現效率時乃依循過去所建立之方法 [13, 20]，將各菌株少量培養於試管中，經 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 之誘導處理後，收集部分菌液進行電泳分析，並以TAV 抗體(Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 進行西方轉漬試驗(western blotting test)，確定具有 TAV 免疫訊號之蛋白帶位置，並比較各菌株表達TAV 鞘蛋白之效率。

TAV 鞘蛋白之大量表現及回收

獲得合適菌株後依循過去所報告之方法將其大量繁殖[13]，並以IPTG 誘導蛋白表現及以 rifampicin 抑制非專一性蛋白之產生，最後將培養液離心收集所有菌體，利用-20℃反覆冷凍及解凍處理，並以超音波震盪打破細菌促使表現蛋白釋出，再以過去所報告之製備型電泳法 (preparative electrophoresis) 將TAV 鞘蛋白基因之表現蛋白加以分離、濃縮、純化並於-80℃下保存備用 [12]。

血清及免疫球蛋白之製備

製備對應細菌表現之 TAV 鞘蛋白之多元抗體乃於紐西蘭白兔上進行，其免疫與採血程序均遵照過去所發表之報告爲之 [12, 13]。每週注射一次，每次施打於白兔體內之純化表現蛋白量均調整爲 1 mg 。總共進行四次免疫注射，第四次注射後第七天開始進行耳朵靜脈採血，爾後每週固定採血一次，每次約採50-60 ml 全血。全血於 37℃ 水浴下靜置 4 小時促進凝血後再將血清加以分離，所得血清置於-30℃ 下冷凍保存，或冷凍乾燥後真空保存於 4℃ 備用。免疫球蛋白G (Immunoglobulin G, IgG) 之純化亦遵

照過去報告之程序進行 [12, 13]，純化之 IgG 則定量於 1 mg/ml 儲存於 4℃。

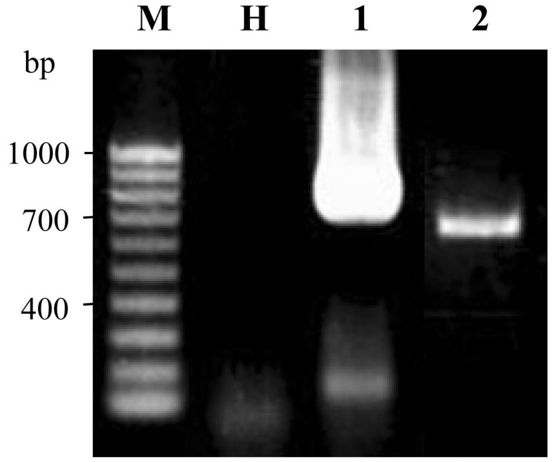
南方轉漬雜合法及化學冷光偵測

將 PCR 產物之電泳分析膠片以毛細法 [22] 轉漬於尼龍膜上 (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)，再以 UV cross linker (1200×100 μj/cm^2) 處理以促進 DNA 與尼龍膜之緊密結合；其後以非放射性標定試劑組 (BrightStar™ Psoralen-Biotin, Ambion Inc. Texas, USA) 循廠商建議之程序進行探針之製備及雜合反應，再以 AVIDx-AP 試劑組 (Tropix Inc., MA, USA) 對發生專一性雜合標定之 PCR 產物進行偵測，所得結果以 CDP-star 試劑組 (Tropix Inc., MA, USA) 進行冷光顯影於 X-ray 底片上。

結　果

TAV之鞘蛋白基因選殖

我們根據 O'Reilly *et al*. 所發表之 TAV 鞘蛋白基因序列 [21] 設計一對可以增幅出完整 TAV 鞘蛋白基因之專一性



圖一、應用反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 增幅番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 鞘蛋白 (CP) 基因。1：以引子對 (TAV-up/TAV-dw) 由彰化縣所採集之菊花樣品進行 RT-PCR 所增幅之 780 bp 產物。2：利用引子對 (TAV-up1/TAV-dw1)與上述 780 bp 產物選殖於 pCR II-TOPO 質體 DNA 進行 PCR 反應，將完整之 TAV CP 轉譯架構增幅出來之結果。M 為標準 100 bp DNA 梯級標誌。H 為利用引子對 (TAV-up/TAV-dw) 與健康菊花樣品進行 RT-PCR 結果。

Fig. 1. Amplification of *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein (CP) gene by polymerase chain reaction (PCR). A 780 bp DNA product was amplified from field collected chrysanthemum specimen using primer set (TAV-up/TAV-dw) by reverse transcriptase PCR (lane 1). The product was cloned into pCR II-TOPO plasmid which was subsequently used as template for PCR amplification of open reading frame of TAV CP by the use of primer set (TAV-up1/TAV-dw1). A 652 bp product was thus obtained (lane 2). Lane H is the RT-PCR amplification from healthy chrysanthemum using the former primers. Lane M is 100 bp DNA ladder markers.

引子 (TAV-up 及 TAV-dw)。利用此引子對與經由 ELISA 反應確定感染 TAV 之國華芳菊上所抽取之全量 RNA 模版進行 RT-PCR，發現可穩定增幅獲得一個約 780 bp 之核酸產物 (圖一, lane 1)。將此產物選殖於 pCR II 載體得到一轉殖株。此轉殖株之嵌入片段經自動核酸定序分析後，獲得一全長含 776 個核苷酸之序列，其內所含之單一轉譯架構具有 220 個胺基酸訊息 (圖二)，此序列經比對解析後發現其核酸序列與已知之 TAV 鞘蛋白基因核苷酸序列 (D01015) [21] 相同度 (identity) 達到 92 %，胺基酸序列相同度則高達 93 %。顯示增幅所獲之序列確實為 TAV 之鞘蛋白基因。

TAV 鞘蛋白基因載體之構築

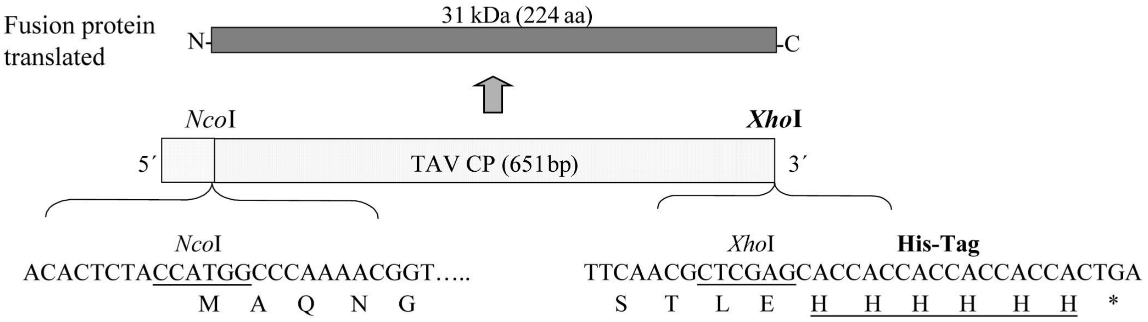
根據上述所獲之 TAV 鞘蛋白基因序列我們進一步設

```
     TAV-up
ACACTCTAGAATGGCCCAAAACGGTACGGGAGGAGGAAGCCGACGTCCACGTCGTGGTCG 60
         M  A  Q  N  G  T  G  G  G  S  R  R  P  R  R  G  R 17
TCGCAATAATAACAACAACAATATCTCGACTGCTCGTGACAAAGCTCTTTTGGCTTTAAC 120
 R  N  N  N  N  N  N  I  S  T  A  R  D  K  A  L  L  A  L  T 37
ACAGCAAGTCAATCGCTTAGCGAATATAGCTTCCTCTAGTGCGCCATCCCTTCAACATCC 180
 Q  Q  V  N  R  L  A  N  I  A  S  S  S  A  P  S  L  Q  H  P 57
GACTTTTATTGCTAGCAAGAAGTGTCGTGCAGGTTATACTTACACTTCGTTGGATGTCCG 240
 T  F  I  A  S  K  K  C  R  A  G  Y  T  Y  T  S  L  D  V  R 77
ACCGACTAGAACTGAGAAGGACAAGAGTTTCGGTCAAAGGTTAATTATCCCAGTACCCGT 300
 P  T  R  T  E  K  D  K  S  F  G  Q  R  L  I  I  P  V  P  V 97
GTCTGAATACCCTAAGAAGAAGGTCTCATGTGTGCAAGTGAGGCTGAACCCATCCCCAAA 360
 S  E  Y  P  K  K  K  V  S  C  V  Q  V  R  L  N  P  S  P  K 117
GTTTAATTCTACGATTTGGGTTTCGCTTCGTCGTCTGGACGAAACGACTCTTCTTACTTC 420
 F  N  S  T  I  W  V  S  L  R  R  L  D  E  T  T  L  L  T  S 137
TGAAAACGTGTTTAAACTGTTCACCGACGGTCTCGCAGCCGTCCTTATTTATCAGCACGT 480
 E  N  V  F  K  L  F  T  D  G  L  A  A  V  L  I  Y  Q  H  V 157
TCCCACCGGTATCCAACCTAACAATAAGATCACCTTCGACATGTCTAATGTCGGTGCTGA 540
 P  T  G  I  Q  P  N  N  K  I  T  F  D  M  S  N  V  G  A  E 177
GATCGGCGATATGGGCAAATATGCCCTAATAGTCTATTCCAAAGACGATGTCCTCGAAGC 600
 I  G  D  M  G  K  Y  A  L  I  V  Y  S  K  D  D  V  L  E  A 197
CGATGAAATGGTGATCCATATTGATATAGAGCACCAGCGTATTCCTTCCGCTTCAACGCT 660
 D  E  M  V  I  H  I  D  I  E  H  Q  R  I  P  S  A  S  T  L 217
CCCGGTGTGATTCGACACGCATGCACGACGTCCGAAGACGTTAAACTACGCTTGAACTGT 720
 P  V  *                                                     220
GTTCGAGTGTCTGAGTTGGTAGTATTGCTCTAAACTACCTGAAGTCACTAAATGCT     776
                                          TAV-dw
```

圖二、台灣分離之番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) RNA 3 之 3' 核苷酸及胺基酸序列。此序列乃利用 TAV-up 及 TAV-dw 引子對 (序列下畫線者) 以反轉錄聚合酵素連鎖反應由採自彰化縣之菊花樣品所增幅後解序者。(*)代表蛋白轉譯終止訊號。

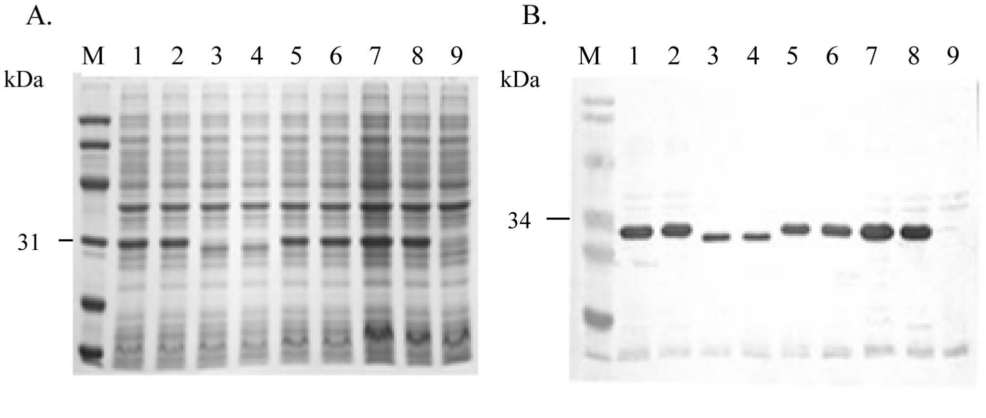
Fig 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences amplified from 3'-terminal region of RNA 3 of *Tomato aspermy virus* (TAV) isolated from Taiwan. The sequence was obtained by RT-PCR amplification using TAV-up and TAV-dw primers (underlined). Symbol of * indicates translation stop codon.

計一對可以增幅全長度 TAV 鞘蛋白基因並可快速構築於表現載體 (pET-28b (+), Novangen) 之專一性引子 TAV-up1 (5'-ACACTCTACCATGGCCCAAA-3') 及 TAV-dw1 (5'-ATCACACCTCGAGCGTTGAA-3')。爲利於TAV 鞘蛋白能以正確方向構築於表現載體，我們分別於上下游引子對加入 *Nco* I 與 *Xho* I 限制酶切位 (畫線者)。以此引子對與含TAV 鞘蛋白基因嵌入序列之 pCR II 質體DNA 進行PCR 反應，於 55℃ 下進行黏合，經過30 個循環放大後獲得預期之652 bp TAV CP 產物(圖一, Lane 2)。所獲產物以材料與方法中所述之程序構築於 pET-28b (+) 載體 (圖三) 並轉殖於 *E. coli* DH5 α 菌株中。逢機挑選24 個轉型株菌落，經PCR 篩選後證實其中 12、14、19 及 23 號轉殖菌株具有預期大小之嵌入片段，故抽取此四菌株所含之 pET-28b (+) 質體DNA 將其轉殖於蛋白表達專用菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 上以進行蛋白質之大量表現。每一編號各選取二個轉型成功之菌株進行蛋白表現分析。



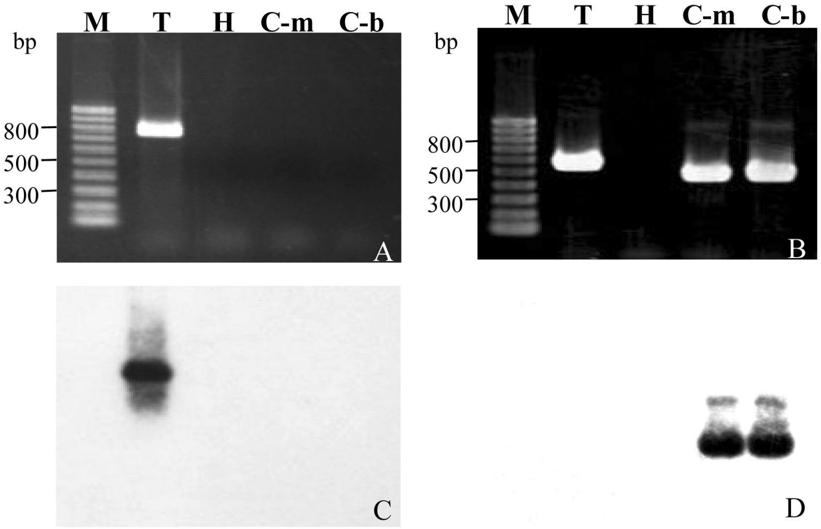
圖三、構築番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 完整鞘蛋白 (CP) 基因於表現載體 pET-28b (+) 之上下游相關位置及轉譯之氨基酸序列。TAV CP 完整轉譯架構共含 651 bp 經由上下游之 *Nco* I 及 *Xho* I 限制酶切位構築於多重選殖區。表現蛋白轉譯起始於 *Nco* I之 ATG 位置，終止於表現載體之 TGA 位置，其 C 端有六個屬於表現載體之 Histidine 序列及一個屬於 *Xho* I 序列之 E，分子量估計爲 31 kDa。

Fig. 3. Schematic representation of the construction of full-length coat protein gene of *Tomato aspermy virus* (TAV) in the expression vector pET-28b (+). The upper map shows the detail sequence linkage between TAV CP and pET-28b (+). Protein translation starts from the ATG codon of the *Nco* I site and terminates at the TGA codon provided by the expression vector. The expressed protein contains TAV CP and another 7 amino acid residues including 6 repeated histidine from pET-28b (+) and one glutamic acid encoded by *Xho* I sequence. The lower map indicates the relative size of the translated protein with an molecular weight of 31 kDa calculated by Scan DNASIS program.



圖四、細菌表現番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 鞘蛋白基因之分析。圖 A，不同選殖株蛋白表現之SDS-PAGE電泳分析。M 行，標準分子量蛋白。1 至8 行分別爲含嵌入TAV 鞘蛋白基因序列之選殖株12-1, 12-2, 14-1, 14-2, 19-1, 19-2, 23-1 及23-2 之蛋白表現分析。行 9 爲不含嵌入TAV 鞘蛋白基因序列之對照菌株。圖B，圖A 之電泳膠片以TAV 抗體(Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 進行西方轉漬(western blotting) 之分析圖。

Fig. 4. Analyses of *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein (CP) expressed by selected bacteria clones in Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (A) and western blotting (B) with antiserum against TAV (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA). Lane M, protein standard markers; Lane 1-8, IPTG induced bacteria lysate of bacteria clones 12-1, 12-2, 14-1, 14-2, 19-1, 19-2, 23-1 and 23-2 containing TAV CP gene inserted expression vector pET-28b (+); Lane 9：IPTG induced bacteria lysate without TAV CP gene inserted pET-28b (+).



圖五、利用專一性引子對進行反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 及核酸探針雜配法 (DNA probe hybridization) 鑑別番茄種子不稔病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)。圖 A，應用 TAV 專一性引子對 (TAV-up/TAV-dw) 進行RT-PCR 結果。M 行，標準100 bp DNA 梯級標誌。T, H, C-m 及C-b 行分別爲感染TAV 之菊花、健康菊花、感染 CMV 之馬兜鈴及感染 CMV 之煙草材料。圖 B，應用CMV 專一性引子對(CMV-up 及CMV-dw) 進行RT-PCR 結果。各行之樣品同圖 A。圖 C，將圖 A 之電泳膠片以 TAV 專一性探針進行雜配反應之結果。圖 D，將圖 B 之電泳膠片以CMV 專一性探針進行雜配反應之結果。

Fig. 5. Differentiation of *Tomato aspermy virus* (TAV) from *Cucumber mosaic virus* (CMV) by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and DNA probe hybridization. (A), Result of RT-PCR using TAV specific primer set (TAV-up/TAV-dw). (B), Result of RT-PCR using CMV specific primer set (CMV-up/ CMV-dw). (C), Southern blot hybridization result of the same samples from figure (A) using biotin-labeled DNA probe specific to TAV. (D), Southern blot hybridization result of the same samples from figure (B) using biotin-labeled DNA probe specific to CMV. Lane M, 100 bp DNA ladder markers; Lane T, H, C-m, C-b are TAV-infected chrysanthemum, healthy chrysanthemum, CMV-infected Aristolochia zolligeriana and CMV-infected Nicotiana benthamiana, respectively.

TAV 鞘蛋白基因之大量表現

將上述各轉殖株於 37℃ 培養 3.5 小時，加入 100 ppm 之 IPTG 誘導蛋白之大量表現，30 分鐘後再加入 200 ppm 之 rifampicin 以抑制非專一性蛋白之產生，持續培養 3 小時後收集部分培養菌液進行 SDS-PAGE 電泳分析。結果 12、19 及 23 等三個轉殖株均比未含嵌入序列之對照菌株多出一個 31 kDa 之蛋白條帶 (圖四A)，經西方轉漬試驗確定此蛋白可與 TAV 抗體反應 (圖四B)，證實其即爲細菌表達之 TAV 鞘蛋白。由各轉殖株蛋白表達結果判斷，12 號菌株在表現量及背景清晰度上均較其他菌株優異 (圖四，lanes 1-2)，故選取其作爲後續 TAV 鞘蛋白大量表現之標的菌株。將此菌株大量培養於 250 ml 之離心管中，依前述程序誘導蛋白大量表現，再以製備型電泳法將上述 31 kDa TAV 鞘蛋白加以純化。估計依此程序每100 ml 細菌培養液約可獲得1.5 mg 之TAV 鞘蛋白。

TAV 抗血清之製備與應用

將純化之細菌表現TAV 鞘蛋白注射於紐西蘭白兔以製備抗血清。所得之抗血清 (TAV-CP Ab) 在 SDS-immunodiffusion test 中與純化之細菌表現TAV 鞘蛋白可產生沈澱反應，但與感染 TAV 之菊花葉部組織及健康對照抗原均不產生反應 (結果未出示)。但在ELISA 反應下TAV-CP Ab 可與感染TAV 之田間菊花樣品產生明顯反應，而且在同一稀釋濃度下TAV-CP Ab 與每一樣品之反應值均高於購自Agdia Inc. 之TAV 抗體(TAV-Ab) 所測得之數值，而且與健康菊花對照抗原之反應值亦明顯低於 TAV-Ab 抗體所測得之數值(表一)。此結果確定利用細菌表現之 TAV 鞘蛋白所製備之抗體確實可應用於 ELISA 以偵測菊花樣品有否遭受TAV 感染。試驗結果中購自 Agdia 之 TAV-Ab 並不與本研究所製備之細菌表現TAV 鞘蛋白反應 (表一)，此現象說明該抗體可能由純化之病毒顆粒免疫而產生，故不與經SDS 處理之細菌表現蛋白反應。

由於 TAV 與國內普遍發生之 CMV 同爲 *Cucumovirus* 屬病毒，且經序列比對二者鞘蛋白之胺基酸序列約有 48 % 之相同度。爲了解本試驗所製備之 TAV 細菌表現鞘蛋白抗體 (TAV-CP Ab) 是否有區別此二病毒之效果，我們進行 ELISA 交叉試驗，結果發現 TAV-CP Ab 與 Agdia 之 TAV-Ab 均能與 CMV 抗原產生明顯交叉反應 (表一)，雖然二個 TAV 抗體對其同源 TAV 抗原 (homologous TAV antigen) 之反應值均明顯高於與異源 CMV 抗原 (heterologous CMV antigen) 之反應值，但此結果顯示應用 TAV 抗體仍會偵測到 CMV 之感染 (表一)。反之，本實驗室過去所製備對應 CMV 純化病毒之抗體並不與 TAV 之細

菌表現鞘蛋白或感病菊花樣品產生任何反應，顯示應用CMV 抗體仍可明確將CMV 與TAV 加以區別。

應用分子檢測法區別 TAV 與 CMV 之感染

爲進一步比較TAV 與CMV 之鞘蛋白基因分子特性，以提供病毒分子檢測之參考，本試驗以前述之 TAV 專一性引子對(TAV-up/TAV-dw) 及過去曾報告之CMV 專一性引子對 (CMV-up/CMV-dw) [8, 23]，針對感染TAV 之菊花與感染 CMV 之馬兜鈴與煙草進行 RT-PCR 比較測試。結果TAV 引子對只能與感染 TAV 之菊花反應，增幅出預期 780 bp 之產物，而與CMV 之二個感病材料均不產生任何反應(圖五 A)。反之，CMV 引子對則能由感染TAV 之菊花材料上增幅出一個 600 bp 之產物(圖五 B)，但其大小與增幅自感染 CMV 之馬兜鈴與煙草材料之 500 bp 產物有明顯差異。不過若以 CMV 之 500 bp 產物所製作之探針進行雜合反應時，此探針僅能與本身反應而不與增幅自 TAV 之 600 bp 產物發生雜合(圖五 B)，證實CMV 引子對雖能與TAV 序列反應產生 PCR 產物，但所增幅之 TAV 序列與CMV 者明顯不同。

表一、比較對應細菌表現番茄種子不稔病毒 *Tomato aspermy virus* (TAV) 鞘蛋白之抗體與購自 Agdia Inc. 之 TAV 抗體及CMV 抗體應用於ELISA 中對田間菊花樣品之反應性

Table 1. Reactivities in indirect ELISA of the antiserum against bacteria expressed *Tomato aspermy virus* (TAV) coat protein (TAV-CP Ab) compared to commercialized (Agdia Inc.) TAV antiserum (TAV-Ab) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) antiserum produced in our laboratory [1]

Sample number	Antisera		
	TAV-CP Ab	TAV-Ab	CMV
1	0.795 [2]	0.700	0.162
2	0.906	0.801	0.168
3	0.782	0.391	0.183
4	1.683	0.646	0.170
5	0.785	0.497	0.157
6	1.428	0.480	0.121
7	0.253	0.215	0.165
8	0.288	0.218	0.146
Bacteria-expressed TAV coat protein	2.396	0.198	0.037
CMV-infected tobacco	0.939	0.335	3.308
Healthy chrysanthemum	0.057	0.123	0.106

1 Antigen-coating type of indirect ELISA as described previously [13] was conducted to compare the reavtivitites of antiserum against bacteria expressed TAV CP with those of antisera to TAV antisrum purchased from Agdia Inc. and CMV antiserum produced in our laboratory.

2 Reactivities of the antisera are shown as the absorbance readings (A_{405nm}) taken 40 min after the addition of enzyme substrate solution. The figures shown are averaged value of four replicate wells. Absorbance readings of test samples higher than two times of healthy control chrysanthemum readings are considered to be positive reaction.

討　論

綜合以上實驗，我們根據購自 Agdia 之 TAV-Ab 能夠檢測到國內菊花有正反應之植株，且利用已知 TAV 鞘蛋白基因序列所設計之專一性引子對也可以由與 TAV 抗體正反應之菊花材料中增幅出符合預期大小之產物；加上該產物序列之解序結果與 GenBank 上已知 TAV 鞘蛋白基因序列達到 92 % 以上之相同度，證明本研究所獲得之菊花樣品確實已遭受 TAV 的感染。根據我們的理解，此乃TAV 發生於台灣作物上之首度正式報告。

根據本研究之調查，TAV 感染國內試驗改良場所所保存之菊花種源及農民應用中之母本園情況已經頗爲普遍(結果未出示)，因此推測 TAV 可能隨菊花品種之引進，加上菊花種苗無性繁殖之特性，早已長期存在國內菊花植株中。根據我們的觀察，國內現有商業生產用之菊花品系感染TAV 後並不表現明顯病徵，唯有在秋冬寒冷季節才會在葉部出現輕微斑紋癥狀，但當氣候回暖病徵即消失，顯示國內多數商業用菊花品系可能對 TAV 均有某種程度之抗病性，或者由於我國全年氣候普遍溫暖炎熱而與 TAV 之發病條件並不吻合。此現象可能是導致國內菊花栽培業者多年來忽略病毒病害重要性的主要原因。其實，國際菊花產業與種苗業者過去對於 TAV 所造成之危害體驗甚深 [10, 18]，因此對於 TAV 及其他菊花病毒之防治管理極爲注重，多年來菊花病毒之監測與種苗驗證早已成爲國際間菊花種苗銷售流通之必要程序 [10, 18]。我國過去由於菊花產業之特質對於菊花病毒之研究並未積極開展，但本研究之結果已證明TAV 確實普遍存在台灣菊花，過去雖然菊花業界並未面臨病毒病之挑戰，但未必能保證未來當產業進一步朝精緻化發展，或在引進新型菊花品系時不會遭受現有或外來 TAV 之攻擊。因此本文謹提醒國內菊花產業需未雨綢繆，重視病毒病之管理方能符合菊花產業發展之國際潮流。此外，文獻記載TAV 除危害菊花外亦有可能感染其他寄主，例如可造成番茄果實產生種子不稔病徵 [17]，故未來國內也因注意此病毒之防疫，除避免其危及國內菊花產業外，亦應防堵其危害其他作物之可能。

根據我們的調查國內菊花複合感染 TAV 與 CVB 之情況十分普遍(結果未出示)，因此欲分離 TAV 而取得大量單獨感染之病株實屬不易，故難以應用傳統方式進行 TAV 病毒顆粒純化以製備多元抗體。雖然藉由融合瘤技術(hybridoma technique) 仍然可以取得單元抗體 (monoclonal antibody)，但此技術所需耗費之人力與物料成本較高，時間上亦不經濟。因此本研究利用細菌表現蛋白之方式取得足量之純化TAV 鞘蛋白，再經免疫程序製備多元抗體，乃一項經濟又快速之作爲。過去本研究室已利用此方法獲得多種病毒之抗體，並證實此種方式所得抗體在應用上與傳統抗體並無差異 [1, 2, 3, 13]。此次試驗亦證明所得 TAV 表現蛋白抗體可應用於ELISA 中偵測菊花之 TAV 感染，且其反應性不亞於購自 Agdia 公司之TAV 抗體。唯一與過去結果不同的是本研究所製備之抗體無法應用於 SDS-immunodiffusion test 中與感病菊花樣品反應，此現象可能與 TAV 鞘蛋白在菊花樣品中之濃度偏低或抗原性有關。不過此特性並未影響此抗體在偵測上之應用效果。

根據文獻 TAV 與國內普遍發生之胡瓜嵌紋病毒 CMV 同屬 *Cucumovirus* 病毒屬，本研究結果亦證實所製備之細

菌表達 TAV 鞘蛋白抗體及購自 Agdia 之 TAV 抗體均能與 CMV 產生交叉反應 (cross reaction)，顯示二病毒之鞘蛋白間確實有親緣關係存在。故未來無法單獨應用 TAV 抗體於 ELISA 下區別 TAV 與 CMV。所幸研究結果亦顯示若配合 CMV 抗體進行雙向試驗 (reciprocal test)，則能順利達到鑑別之目的。此結果亦凸顯雙向試驗在應用血清技術時之重要性。

引用文獻

1. 江芬蘭、林俞君、陳金枝、張清安. 2002. 一種由孤挺花嵌紋病株所分離之馬鈴薯Y屬病毒之分子生物學特性及其抗體之製備與應用. 植物病理學會刊 11:240.
2. 林玫珠、陳金枝、張清安. 2002. 感染菊花之 *Tomato aspermy virus* 鞘蛋白基因表現蛋白多元抗體之製備及其在偵測上之應用. 植物病理學會刊 11:241-242.
3. 張幼莉、陳金枝、張清安. 2001. 印證天鵝絨嵌紋病毒與 Pterostylis virus Y 分子層次相關性之血清學證據 植物病理學會刊 10:210-211.
4. 張清安. 1994. 台灣花卉病毒病害. p. 213-224. 台灣花卉病蟲害研討會專刊. 中華植物保護學會特刊新二號. 277pp.
5. 張清安、林玫珠、陳金枝. 2000. 感染台灣菊花之病毒及類病毒病害發生調查與核酸鑑定技術發展. 植物病理學會刊 9:185-186.
6. 張清安、陳金枝、戴廷恩. 1999. 菜豆黃化嵌紋病毒及胡瓜嵌紋病毒在唐昌蒲葉片之分部及其對病毒檢測之影響. 植病會刊 8:117-120.
7. 張錦興、張元聰、王仕賢. 2000. 雲嘉南地區菊花產業簡介. 台南區農業專訊 32:13-19.
8. 陳金枝、張清安、林玫珠、方懷聖. 2000. 胡瓜嵌紋病毒感染引起的港口馬兜鈴嵌紋病之鑑定. 植物病理學會刊 9:29-34.
9. 黃勝忠、許謙信. 2002. 菊花的品種改良—從雜交育種到生物技術之應用. 科學發展月刊 351:18-23.
10. Bouwen, I., and van Zaayen, A. 1995. Chrysanthemum viruses. p. 396-408. In: Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. Loebenstein, G. *et al*. (eds.), John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom.
11. Brierley, P. 1955. Sympotoms induced in chrysanthemums on inoculation with the viruses of mosaics, aspermy, and flower distortion. Phytopathology 45:2-7.
12. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vien potyviruses. Phytopathology 78:1266-1275.
13. Chen, C. C., Hsiang, T., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:13-20.
14. Daughtrey, M. L., Jones, R. K., Moyer, J. W., Daub, M. E., and Baker, J. R. 1997. Tospoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. Plant Dis. 81: 1220-1230.
15. Diener, T. O., and Lawson, R. H. 1973. Chrysanthemum stunt: A viroid disease. Virology 51:94-101.
16. Hadidi, A., Levy, L., Podleckis, E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. p.167-187. In: Molecular methods in plant pathology. Singh, R. P., and Singh, U. S. (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.
17. Hollings, M., and Stone, O. M. 1971. *Tomato aspermy virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 79.
18. Horst, D. R., and Nelson, P. E. 1997. Compendium of chrysanthemum diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, 62 pp.
19. Moran, J. R. and Wilson, J. M. 1985. Rates of reinfection with virus in commercial carnation, chrysanthemum and gladiolus crops. Acta. Hort. 164:325-332.
20. Nechushtan, H., Zhang, Z., and Razin, E. 1997. Microphthalmia (*mi*) in murine mast cells: Regulation of its stimuli-mediated expression on the translational level. Blood 89:2999-3008.
21. O'Reilly, D., Thomas, C. J., Coutts, R. H. 1991. *Tomato aspermy virus* has an evolutionary relationship with other tripartite RNA plant viruses. J. Gen. Virol. 72:1-7.
22. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
23. Singh, Z., Jones, R. A. C., and Jones, M. G. K. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. Plant Dis. 79:713-716.

ABSTRACT

Lin, M. J.[1], Chang, C. A.[1, 2], Chen C. C.[1], and Cheng, Y. H.[1] 2004. Molecular and serological detection of *Tomato aspermy virus* infecting chrysanthemum in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 13: 291-298. ([1.] Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan, R. O. C., [2.] Corresponding author, E-mail: cachang@wufeng.tari.gov.tw)

Chrysanthemum is an ornamental crop with significant international importance. *Tomato aspermy virus* (TAV) is known to induce malformation of floral parts on sensitive chrysanthemum cultivars jeopardizing the quality and yield. We designed a set of primer (TAV-up/TAV-dw) according to TAV's coat protein (CP) gene sequence documented in the GenBank (accession No. D01015) and successfully amplified a 780 bp DNA product by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) from chrysanthemum specimens collected from Chang-Hua County, the major chrysanthemum production area in Taiwan. The product was cloned and sequenced. It was found to consist of 776 nucleotides (nts) corresponding to the genome organization of the 3'-terminal region of RNA 3 of cucumoviruses. The only open reading frame deducing in this sequence contains 220 amino acid residues coinciding to the size of reported TAV CP. Comparing with the known sequence of TAV CP (D01015), the percent identity of nucleotide and amino acid sequences are 92% and 93%, respectively. This result indicates the sequence amplified from chrysanthemum is originated from a strain of TAV. To our knowledge, this is the first report of the occurrence of TAV in Taiwan. In order to produce antiserum against TAV for the purpose of virus identification, we took the approach of cloning and expressing the TAV CP gene in bacteria and using the bacteria expressed CP as immunogen for antiserum preparation. By the use of directional cloning techniques, a 31 kDa fusion protein containing entire TAV CP sequence was highly expressed and purified from *E. coli* cell cultures. An antiserum (TAV-CP Ab) was prepared against the expressed TAV CP and shown to be useful in ELISA for the detection of TAV in chrysanthemum plants. By comparing with commercialized TAV antiserum (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA), the reactivity in terms of EIA readings of TAV-CP Ab to the same dilution of infected chrysanthemum tissue was always higher than that of Agdia's TAV antiserum. Our results also showed TAV-CP Ab, as well as Agdia's TAV antiserum, cross reacted with *Cucumber mosaic virus* (CMV), another commonly found species of *Cucumovirus*. However, no cross reactivity to TAV was found using antiserum to CMV in a reciprocal ELISA test, showing that it is necessary to perform reciprocal ELISA tests to distinguish TAV from CMV correctly. On the other hand, our study showed TAV could be readily differentiated from CMV by RT-PCR using the aforementioned primer set (TAV-up/TAV-dw). This primer set does not amplify any product from the RNA template of CMV but consistently obtains a 780 bp product from TAV.

Key words : chrysanthemum, TAV, expression vector, CMV, PCR, RT-PCR, serology, bacteria expressed virus coat protein